

DERWENT-ACC-NO: 1993-326232**DERWENT-WEEK:** 199341*COPYRIGHT 1999 DERWENT INFORMATION LTD***TITLE:** Prepn. of sterile human thrombin - via pptn. of fibrinogen**INVENTOR:** BOROS, I; COCOS, V**PATENT-ASSIGNEE:** CENT HEMATOLOGIE BUCURESTI[HEMAN]**PRIORITY-DATA:** 1989RO-0141678 (September 19, 1989)**PATENT-FAMILY:**

PUB-NO	PUB-DATE	LANGUAGE	PAGES	MAIN-IPC
RO 105360 A	October 30, 1992	N/A	000	A61K 035/14

APPLICATION-DATA:

PUB-NO	APPL-DESCRIPTOR	APPL-NO	APPL-DATE
RO 105360A	N/A	1989RO-0141678	September 19, 1989

INT-CL (IPC): A61K035/14, A61K035/78**ABSTRACTED-PUB-NO:** RO 105360A**BASIC-ABSTRACT:**

Sterile human thrombin for clinical use is prepd. by putting at pH 5-5.2 a supernatant obtd during sepn of fibrinogen alcoholic pptn., at 4-6 degC in 24 hrs. The ppte. is sepd and activated by a 0.005M CaCl₂ soln. at pH: 6.8-7.0 and by sterile human thrombine derived from a previous prepn. at 37 degC for 45 mins. The mixt is maintained at 20 degC f 11/2-21/2 hrs. The ppt is filtered frozen, and lyophilised at -30 degC. This clinical quality thrombin is applied for treatment of haemorrhagic cases.

DERWENT-CLASS: B04**CPI-CODES:** B04-B04D3; B12-H04;

ROMANIA OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI	BREVET DE INVENȚIE ⁽¹⁹⁾ RO ⁽¹¹⁾ 105360	
	(12) DESCRIEREA INVENȚIEI	
(21) Cerere de brevet nr: 141678 (22) Data înregistrării: 19.09.89 (51) Complementară la invenția brevet nr: (44) Data publicării: 20.07.94	(51) Int. Cl. ⁴ : A 61 K 35/14; A 61 K 35/78	
(66) Cerere internațională (PCT) nr: data: (67) Publicarea cererii internaționale nr: data: (68)	(30) Prioritate: (32) Data: (33) Țara: (31) Certificat nr:	
(71) Solicitant; (72) Titular: Centrul de Hematologie, București (73) Inventator: medic Boroș Ioan, chim. Cocoș Viorica Blruca, București		

(54) Procedeu de obținere a trombinei umane sterile pentru uz clinic

(57) Rezumat

Invenția se referă la un procedeu de obținere a trombinei umane sterile pentru uz clinic ce constă în precipitarea acidă la pH = 5...5,2 a supernatantului obținut de la separarea prin precipitare alcoolică a fibrinogenului, la temperatura de 4...8°C, timp de 24 h, separarea precipitatului și activarea acestuia cu CaCl₂ soluție de concentrație 5.10⁻³ M la pH = 6,8...7 și trombină umană sterilă dintr-o serie anterioară la tempe-

ratura de 37°C timp de 45 min și menținerea 1h 30 min ...2h 30 min la 20°C, urmată de fiolarea precipitatului, congelarea la -30°C și liofilizarea acestuia.

Se obține într-un timp relativ scurt o trombină umană corespunzătoare din punct de vedere clinic utilizată în terapia de urgență a sindroamelor hemoragice.

Prezenta invenție se referă la un procedeu de obținere a trombinei umane sterile pentru uz clinic, aplicabil în laboratorul de preparare a produselor derivate din sânge.

Pentru obținerea trombinei se cunoaște un procedeu ce constă în precipitarea factorilor de coagulare din plasma umană integrală diluată 1 : 9 în apă distilată, la $pH = 5...5,2$ asigurat cu o soluție de acid acetic glacial, urmată de activarea acestora în prezența ionilor de calciu la $pH = 6,4...7$ la temperatura camerei timp de 24 h și în final formarea protombinazei prin menținerea la $4^{\circ}C$ timp de 24 h, enzimă care transformă protrombina în trombină.

De asemenea, este cunoscut un procedeu de obținere a trombinei umane din plasmă prin precipitare acidă, dizolvare în soluție de $NaCl$ 0,9% la temperatura de $23...30^{\circ}C$, activare cu $CaCl_2$ și trombokinază, îndepărtarea fibrinei și precipitarea cu acetonă urmată de o purificare a trombinei umane brute astfel obținute.

Procedeele descrise prezintă următoarele dezavantaje:

- durată mare pentru obținerea trombinei umane sterile de uz clinic;

- activarea prelungită, neuniformă pe toată șarja necontrolabilă face să se obțină mai multe serii de trombină cu activitate coagulantă total diferită.

Scopul invenției este elaborarea unui procedeu care să permită obținerea unei trombine umane corespunzătoare din punct de vedere clinic.

Problema pe care o rezolvă invenția constă în stabilirea etapelor și condițiilor de procedeu corespunzătoare scopului propus.

Procedeu, conform invenției, de obținere a trombinei umane sterile de uz clinic, constă în aceea că 500 părți supernatant obținut de la separarea prin precipitare alcoolică a fibrinogenului se diluează 1 : 9 în apă distilată sterilă, se precipită cu 105 părți soluție apoasă de acid acetic 7‰ la $pH = 5,3$ și se lasă în repaus 24 h la temperatura de $4...8^{\circ}C$, se filtrează sub vid, se centrifughează,

după care peste precipitat se adaugă 100 părți soluție apoasă $CaCl_2$ $5 \cdot 10^{-3} M$, se aduce la $pH = 6,8...7$ și se activează cu trombină umană sterilă dintr-o serie anterior preparată, la temperatura de $37^{\circ}C$ timp de 45 min, se menține la $20^{\circ}C$ timp de 1h 30 min...2h 30 min, după care se fiolează, se congelează la $-30^{\circ}C$ și se liofilizează, părțile fiind exprimate în volume.

Se dă în continuare un exemplu de realizare a invenției:

Materia primă, supernatantul obținut de la separarea prin precipitare alcoolică a fibrinogenului din 16 l plasmă umană integrală, se repartizează în eșantioane de 500 ml, se diluează în 4000 ml apă distilată sterilă, rezultând 32 vase a 4500 ml supernatant diluat 1 : 9, se corectează pe fiecare vas pH -ul la 5,3 cu aproximativ 105 ml soluție apoasă acid acetic de concentrație 7‰, la temperatura de $4...8^{\circ}C$ timp de 24 h și se îndepărtează supernatantul cu ajutorul trompei de vid. În acest scop se introduce în vas o țevă de sticlă (un sorb) îndoit la capătul inferior 3...4 cm, astfel ca gaura de aspirare a acestuia să fie deasupra precipitatului.

În acest fel, pe de o parte se face îndepărtarea supernatantului fără a antrenă precipitatul, iar pe de altă parte se controlează riguros cantitatea de precipitat ce trebuie să rămână în vas.

Pentru a împiedica spumarea abundentă a supernatantului în timpul aspirării, la trompa de vid se adaptează un rezervor picurător cu alcool etilic. Precipitatul din două vase se colectează în câte un flacon de 500 ml, rezultând 16 flacoane, se centrifughează flacoanele la 1500 rot/min timp de 40 min, la temperatura de $4^{\circ}C$ și se îndepărtează supernatantul prin aspirarea acestuia cu ajutorul pompei de vid. În vederea activării factorilor de coagulare precipitați anterior, în fiecare flacon se introduc 100 ml soluție apoasă de $CaCl_2$ care conține ioni de calciu în concentrație $5 \cdot 10^{-3} M$ și se face ajustarea pH -ului la 6,8...7,0 cu o soluție apoasă de 2% Na_2CO_3 . Cele 16 flacoane cu suspensie calcică se adună într-un balon colector de 3 l, prin aspirare

cu ajutorul pompei de vid, pentru a rezulta astfel o singură serie de trombină. Pentru a grăbi declanșarea procesului de activare se introduce în acest balon ca inițiator de activare, trombina umană sterilă dintr-o serie anterior preparată (10 sticlute resuspendate în 20 ml ser fiziologic). Pentru a crea condiții optime de activare și de formare a trombinei, se introduce balonul în baie de termostatare, la 37°C, timp de 45 min. Se introduce apoi balonul în termostaț la 20°C pentru continuarea procesului de activare și a trombinei, și după o oră și 30 min se face controlul activității coagulante al trombinei la o diluție 1:256. După un timp variind între 1 h 30 min și 2 h 30 min, timpul de coagulare se înscrie în condițiile impuse (20...40 s). Balonul de trombină format se răcește la 0°C timp de 30 min. Se introduce apoi în vas cu gheață și se fiolează câte 2 ml suspensie trombină în sticlute tip penicilină. În timpul fiolării se fac 3...4 însămânșări pe medii de cultură pentru controlul bacteriologic.

Se congelează sticlutele la -30°C, se liofilizează și se face control bacteriologic al produsului liofilizat și control al activității coagulante.

Procedeul, conform invenției, prezintă următoarele avantaje:

- permite o valorificare superioară a plasmei umane (din aceeași unitate de materie primă obținându-se două produse diferite: fibrinogenul și trombina);

- permite recuperarea controlată a precipitatului care conține factorii de coagulare ce ne interesează;

- reducerea considerabilă a timpului

de lucru afectat procesului tehnologic prin:

- asigurarea, cu ajutorul soluției de CaCl_2 a concentrației optime de ioni de calciu necesari desfășurării procesului de coagulare;

- stimularea ratei de reacție prin introducerea de trombină sintetizată anterior;

- crearea pH-ului și a condițiilor termice optime desfășurării procesului de coagulare.

Revendicare

Procedeu de obținere a trombinei umane sterile pentru uz clinic, prin diluare, precipitare acidă, sedimentare, activare cu catalizatori, congelare și liofilizare, caracterizat prin aceea că, 500 părți supernatant obținut de la separarea prin precipitare alcoolică a fibrinogenului se diluează 1 : 9 în apă distilată sterilă, se precipită cu 105 părți soluție apoasă de acid acetic 7‰ la pH = 5,3 și se lasă în repaus 24 h la temperatura de 4...8°C, se filtrează sub vid, se centrifughează după care peste precipitat se adaugă 100 părți soluție apoasă CaCl_2 5.10⁻³ M, se aduce la pH = 6,8...7 și se activează cu trombină umană sterilă dintr-o serie anterior preparată, la temperatura de 37°C, timp de 45 min, se menține la 20°C timp de 1 h 30 min...2 h 30 min, după care se fiolează, se congelează la -30°C și se liofilizează, părțile fiind exprimate în volume.

(56)Referințe bibliografice

J. Biol. Chem. 1940 U.133, pp. 761...764
Chemical Abstracts 61/1964

Președintele comisiei de invenții: biolog Nicola Nicolin
Examinator: farm. Popescu Aurelia